12-11

Reporter Assay Kit
-SEAP-

(Code No. SAK-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3686K

― 目次 ―

	ページ
［１］はじめに	２
［２］キットをお使いになる前に	２
［３］キットに含まれるもの	３
［４］プロトコール	４
・キットの他に必要なもの	４
・アッセイ手順	４
・ポジコン溶液について	５
［５］トラブルシューティング	６

ご注意

本試薬は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。また本試薬の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し，安全に留意してください。

［1］はじめに

遺伝子の発現調節において重要な働きをしているプロモーターやエンハンサー、あるいはそれらに結合する転写因子などの解析を行う方法として、従来よりレポーターアッセイが広く用いられています。Reporter Assay Kit -*SEAP*-は、簡便なレポーターアッセイとして近年注目されているSEAP(分泌型アルカリフォスファターゼ)を検出するためのキットです。SEAPレポーターアッセイではレポータータンパク質が細胞外に分泌されるため、通常のレポーターアッセイで必要とされる細胞溶解の操作が不要です。このため、同一サンプル中の遺伝子発現の経時的な変化を追跡することも可能です。また、SEAPは多くの細胞が産生する内在性のアルカリフォスファターゼのアイソザイムより熱安定性が高く、また試薬に対する感受性も異なるため、内在性アルカリフォスファターゼの混在するサンプルからの選択的な活性測定が容易です。本キットは以下のような特長をもっています。

特長

- 内在性アルカリフォスファターゼの影響を無くすのに新規なインヒビターを用いており、高温での加熱処理が不要。
- 高感度な化学発光基質を用いており、また広範なレンジ(4～5桁)で測定可能。
- 短時間でアッセイが終了(サンプルリングから測定終了まで 1～1.5時間ぐらい)。
- 96ウェルプレートとルミノメーターを用いることにより、多サンプルを高速処理することが可能。

［2］キットをお使いになる前に

- SEAPはヒト胎盤由来アルカリフォスファターゼの細胞膜結合ドメインを遺伝子改変により欠失させたものです。従って、胎盤由来の細胞、及び同タイプのAPを生産する組織（肺、精巣、子宮頸など）由来の細胞では内在性のアルカリフォスファターゼを十分に失活させることができず、正確な測定を行うことが出来ません。また、腸由来の細胞にも熱安定(あるいは薬剤耐性)なアイソザイムを産するものがあり、バックグランドが高くなる可能性があります。このような細胞を用いる場合は他のレポーターアッセイ系を用いることをお薦めします。
- 本キットにはタンパク質変性剤やヒト組織由来の酵素が含まれている溶液があります。ご使用の際には保護具を着用し、安全に気を付けて取り扱ってください。

参考文献

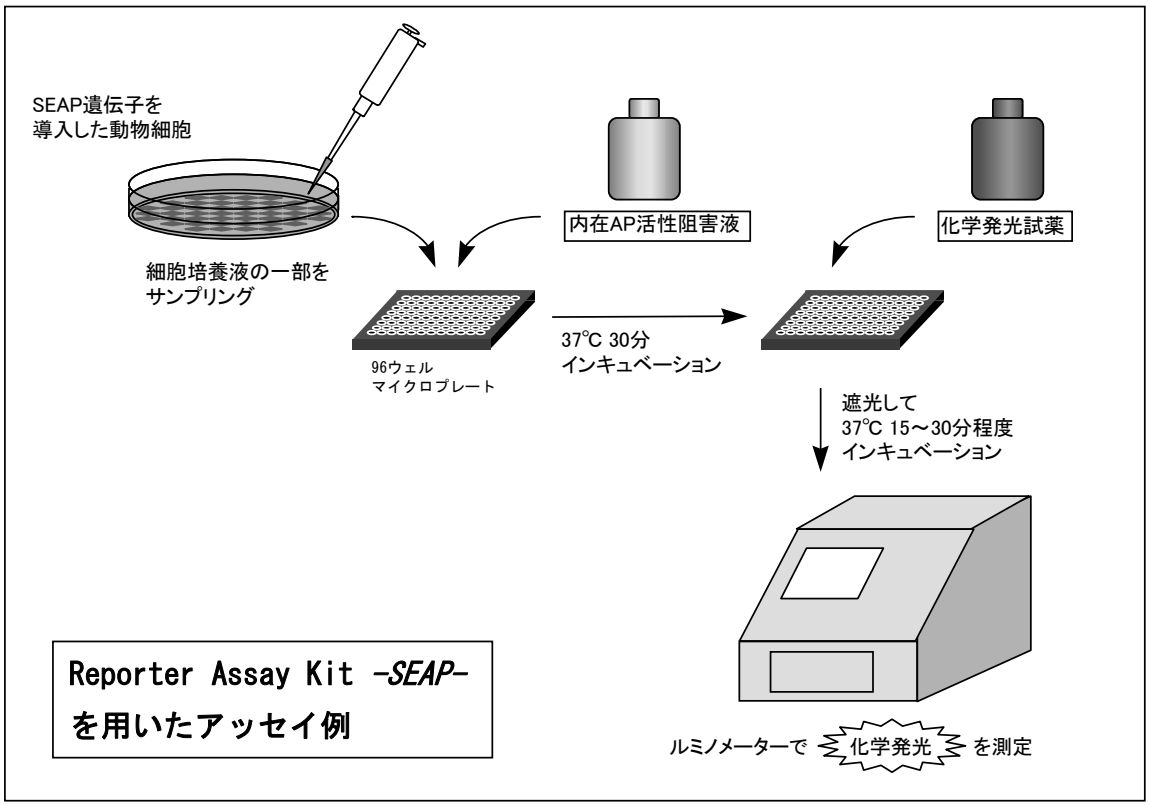
* J.Berger, J.Hauber, R.Hauber, R.Geiger and B.R.Cullen (1988) Gene **66** 1-10
* J.Alam and J.L.Cook (1990) Analytical Biochemistry **188** 245-254
* B.R.Cullen and M.H.Malim (1992) Methods In Enzymology **216** 362-368
* H.Akhavan-Tafti, A,Schaap, Z.Arghavani, R.DeSilva, R.Eickholt, R.Handley, B.Schoenfelner, K.Sugioka and Y.Sugioka (1994) T.Biolumin.Chemilumin. **9** 155-164
* 西郷 薫, 佐野 弓子共訳 (1997) CURRENT PROTOCOLSコンパクト版　分子生物学実験プロトコールⅡ 288-298

［3］キットに含まれるもの

- **化学発光試薬 (Lumi-Phos® Plus):　100 ml**
- **内在AP活性阻害液:　15 ml**
- **ポジコン溶液:　0.1 ml**

＊ Lumi-Phos®は Lumigen, Inc. の登録商標です。

- ポジコン溶液には、ヒト胎盤由来のアルカリフォスファターゼが用いられています。HIV,HBV等のコンタミネーションがないことは検査済みですが、ヒト組織由来であるため未知ウイルス等のコンタミの可能性は完全には否定できません。安全のため手袋等の保護具を着用し、皮膚への付着のないように気を付けて取り扱ってください。
- また、化学発光試薬及び内在AP活性阻害液には、有機溶剤やタンパク質変性剤が含まれています。これらの溶液についてもポジコン溶液と同様、ご使用の際には保護具(手袋や保護めがね等)を着用し、安全に注意して取り扱ってください。**万一、目に入った場合には、きれいな水で十分に洗い流した後、医師の診察を受けてください。**



［4］プロトコール

キットの他に必要なもの

・発光を測定、検出する機器・器具
（ルミノメーター、X線フィルムなど）
・96ウェルマイクロプレート
（あるいは、使用する測定機器に対応したセルなど）
・1.5mlマイクロチューブ

アッセイ方法

（96ウェルマイクロプレート対応型ルミノメーターで測定を行う場合）

Step 1.　SEAP活性を測定する培養細胞(サンプル)の培養液50～500μl程度を、1.5mlマイクロチューブに移します。

Step 2.　4℃、15,000rpmで5分間遠心します。

・ この操作は必ずしも必要なものではありませんが、培養液中の細胞カスなどの異物を取り除くために行う方が望ましいです。

Step 3.　上清20μlを96ウェルマイクロプレートに移します。

Step 4.　20μlの内在AP活性阻害液を加え、よく混合します。

Step 5.　37℃で30分間インキュベーションします。

Step 6.　氷上に1分間静置します。

Step 7.　160μlの化学発光試薬(Lumi-Phos® Plus)を加え、よく混合します。

Step 8.　遮光して37℃、15～30分間インキュベーションします。

・ サンプル中のSEAP活性の大きさにもよりますが、発光シグナルは通常15～30分程度でピークに達した後、徐々に減衰します。

Step 9.　ルミノメーターで5～10秒間程度の発光量を測定します。

・ 遠心チューブや試験管を用いて試薬の混合を行う場合は、各溶液量を全て1.5倍に増やしてアッセイを行ってください。

ポジコン溶液について

ポジコン溶液を用いることにより、アッセイ系が正常に働いていることを確認することができます。この溶液にはヒト胎盤由来のアルカリフォスファターゼが含まれています。

・ポジコン溶液の使い方

サンプルの代わりに1～2μlのポジコン溶液（あるいはその1/10希釈液1～20μl）を用います。

・ご注意

ポジコン溶液はアッセイ系のポジティブコントロールとしてのみ使用し、サンプル中の**SEAP活性の指標としては用いないでください。**

［5］トラブルシューティング

トラブル	考えられる原因	コメント
シグナルが弱い、あるいは全く検出できない	培養細胞へのDNAの導入量が少ない	培養細胞へのトランスフェクションの条件を至適化してください。
	ベクターの問題	プロモーターやエンハンサーが正常に機能していない場合が考えられます。
	内在AP活性阻害処理時の温度・時間が適正でない	内在AP活性阻害液処理時の温度が高い、あるいは時間が長すぎると、SEAP活性も徐々に低下します。
	化学発光試薬の量が適正でない	化学発光試薬の添加量が正しいか確認してください。
	測定機器・装置の故障	測定機器・装置に問題がないか確認してください。
シグナルが強すぎる	サンプル中のSEAP活性が高すぎる	内在AP活性阻害液を加える前のサンプルを培地やPBS(-)などで適当に希釈するか、あるいは検出時間を短縮してください。
バックグランドが高い	内在AP活性阻害処理時の温度・時間が適正でない	内在AP活性阻害液処理時の温度が低い、あるいは時間が短すぎると、内在性APが十分に失活しません。
	用いる細胞種の問題	SEAPはヒト胎盤由来アルカリフォスファターゼの細胞膜結合ドメインを欠失させたものであるため、胎盤型APを生産する組織(胎盤、肺、精巣、子宮頸など)由来の細胞では、内在性のアルカリフォスファターゼを十分に失活させることができません。このような細胞を用いる場合は他のレポーターアッセイ系を用いることをお薦めします。ただし、内在AP活性阻害液処理を行う前に65℃で30分間加熱処理を行う(この場合は37℃でのインキュベーションは不要)ことにより、バックグランドを低減できる細胞種(HeLa細胞など)もあります。

【製造・販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部（大阪）
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部（東京）
〒141-8633　東京都品川区東五反田二丁目 10 番 2 号　東五反田スクエア
TEL 03-6422-4819　FAX 03-6422-4951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間　9:00～12:00 , 13:00～17:00（土、日、祝を除く）
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］ http://www.toyobo.co.jp/bio